

**HAS CUPPER ION ANY EFFECT ON *Sinorhizobium meliloti* BACTERIA?**

Barón-Torcal, B. <sup>1</sup>, Guardia-Molina, A. <sup>2</sup>, Liébana-Medina, A. <sup>3</sup>, Miñán-Polo, S. <sup>1</sup>,  
Sanjuán-Parra, J.M. <sup>1</sup>& Martínez-Abarca F. <sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>IES Padre Manjón, Gonzalo Gallas s/n, 18003 Granada, Spain.

<sup>2</sup>IES Angel Ganivet, Santa Bárbara 15, 18001 Granada, Spain.

<sup>3</sup>IES Fray Luis de Granada, Huerta del Rasillo s/n, 18004 Granada, Spain.

<sup>4</sup>Department of Microbiology and Symbiotic Systems, Estación Experimental del Zaidín,  
CSIC, Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain

\*Corresponding author: **e-mail:** [fmabarca@eez.csic.es](mailto:fmabarca@eez.csic.es)

**SUMMARY**

*Sinorhizobium meliloti* is a soil bacterium that in symbiosis with Alfalfa leguminous plants fixes N<sub>2</sub> to ammonia. This process occurs after an intimate communication between host and microsymbiont in the rhizosphere niche. This soil bacterium may suffer biotic and abiotic stresses in this complex environment. Resistance to any of these stresses can be an advantage for this type of bacteria. In this work we test the effects of Copper ion in the bacterium *Sinorhizobium meliloti*. We found an effect on pigmentation and this effect is specific of each isolate (i.e. it is very pronounced for the isolate AK83 from Aral sea in Russia). On the other hand, comparison of Copper ion resistance phenotype between isolates 1021 and GR4 suggests that the resistance of GR4 could be due to a set of 10 genes found in the cryptic plasmid pRmeGR4a of this strain. However, this resistance phenotype also appears in other isolates, and it could be explained by an alternative phenotype as Exopolysaccharide production (EPS+).

**INTRODUCTION**

*Sinorhizobium meliloti* es una bacteria del suelo que interacciona con plantas leguminosas de alfalfa estableciendo relaciones simbióticas donde la planta aporta el alimento y la bacteria fija el nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) transformándolo en amonio que la planta pueda aprovechar.

El establecimiento de la simbiosis es un proceso complejo dividido en varias fases. Tras un primer contacto y colonización de las raíces por parte del microsimbionte, se produce un intercambio de señales. Así, las raíces de las plantas liberan isoflavonas como señal de estímulo activando los factores de nodulación de estas bacterias. Estos factores de nodulación permiten la deformación del pelo radical (por donde se introduce la bacteria) e inducen paralelamente la organogénesis nodular. Es en el nódulo donde finalmente tiene lugar el proceso de reducción del N<sub>2</sub> a amonio. La importancia del estudio de esta interacción radica en que este proceso simbiótico es el responsable de incorporar aproximadamente el 50% del Nitrógeno a los seres vivos.

Los pasos críticos de esta interacción tienen lugar en una zona de influencia de las raíces de la planta donde la actividad microbiana es muy intensa y que es conocida como rizosfera. Es en la rizosfera donde la bacteria se encuentra expuesta a numerosos estreses tanto bióticos (competencia por alimento,...) como abióticos (pesticidas, metales pesados,...).

Para enfrentarse a todo este conjunto de condiciones, *S. meliloti* posee un gran número de genes, siendo su tamaño genómico casi dos veces el de bacterias como *Escherichia coli*. Con las técnicas de secuenciación actuales, el conocimiento de todos los genes de una bacteria es una posibilidad real. De hecho empiezan a conocerse los genomas de distintos aislados de una misma especie. En el grupo de investigación donde se ha desarrollado este proyecto se acaba de obtener el genoma del aislado GR4 de la bacteria *S. meliloti* (Casadesus y Olivares 1979)

Como hecho destacado se han encontrado 10 genes presentes en el plásmido críptico pRmeGR4a relacionados con posibles transportadores, sensores y oxidasas del ion cobre.

El trabajo desarrollado ha tenido como objetivo estudiar la influencia del ion cobre sobre la bacteria *S. meliloti*. Para ello, se han abordado varios experimentos en medio sólido que muestran un efecto de este ion en la pigmentación de esta bacteria así como un fenotipo de resistencia variable entre los aislados.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains

Table 1: Bacterial strains used in this work. ExoPolysaccharide producers (EPS+) and non producers (EPS-) are indicated

Bacterial strain	Relevant properties	Reference
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	Reference strain, EPS-	Galibert <i>et al.</i> 2001
<i>S. meliloti</i> GR4	Field isolate (Granada Spain), EPS-	Casadesus & Olivares 1979)
<i>S. meliloti</i> SM11	Field isolate (Germany) EPS-	Schneiker-Bekel <i>et al.</i> 2011
<i>S. meliloti</i> AK83	Field isolate (Aral sea, Russia) EPS+	Galardini <i>et al.</i> 2011
<i>S. meliloti</i> BL225C	Field isolate (Lodi, Italy) EPS+	Galardini <i>et al.</i> 2011

### Drop assay

El ensayo de *drop assay* consiste en una medida semicuantitativa de crecimiento de bacterias en medio sólido (Figuras 1 y 2). Para su elaboración se trabaja en condiciones de esterilidad aprovechando, en nuestro caso, la campana de flujo laminar y el mechero Bunsen.

#### Preparación de placas

Se prepararon placas conteniendo medio sólido rico de crecimiento TY-Agar (20 ml). En nuestro experimentos, se añadieron además distintas cantidades de sulfato de cobre (desde un stock a 100 mM) que permitieron analizar curvas de concentración entre 0.0 y 1.2 mM de Cu. Se llevo especial cuidado en la homogeneidad del medio (utilizando el vortex y agitando las distintas soluciones).

#### Preparación de los cultivos.

Cultivos de la bacteria *S. meliloti* crecidos en medio liquido y en agitación durante 24-36h a 28°C fueron cuantificados mediante medidas de turbidez en un espectrofotómetro a 600 nm de longitud de onda. Para ello se ajustó el cero de absorbancia con un tubo blanco conteniendo medio TY sin bacteria. Posteriormente, se miden los tubos conteniendo las bacterias y si el valor de Abs es superior a 0.8 ó 0.9 se diluyen ya que puede no ser fiable la medida. En ese caso se diluyen 5 veces (p. ej. 200 µl de bacteria en 800µl de TY). Esta medida, o sea, el valor obtenido de absorbancia para cada cultivo (fruto de multiplicar por cinco en el caso de que se hayan tenido que hacer diluciones para obtenerlo), es una medida indirecta del nº de bacterias presentes con las que hacer las diluciones seriadas.

#### Preparación de las diluciones seriadas.

Tras las mediciones anteriores, igualamos todos los cultivos hasta una OD de 0.5 a 600 nm. Cultivo al que llamaremos  $10^0$  y del que realizaremos las subsiguientes diluciones. Para ello, preparamos 4 tubos por cultivo que irán desde la dilución  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$ . Cada tubo contiene 180 µl de Agua estéril. Una vez preparados procederemos a realizar las diluciones seriadas. Así, en el primer tubo ( $10^{-1}$ ), añadiremos 20µl de bacteria procedentes del cultivo  $10^0$  y lo agitaremos en vórtex unos segundos para asegurarnos que la bacteria se ha diluido

homogéneamente. Para las siguientes diluciones se procederá de igual manera partiendo de la dilución anterior.

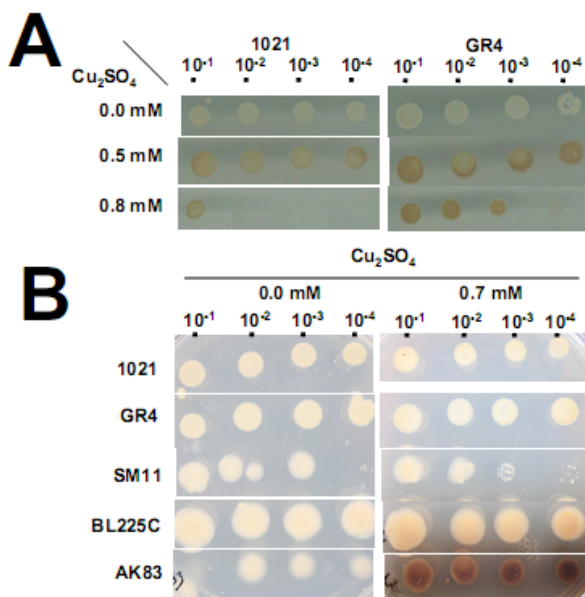
#### Depósito de las gotas

Cada una de las diluciones seriadas de cada aislado se dispondrá en una gradilla. Tras agitarlo de nuevo, 3 µl de cada una de las diluciones se pipetearon sobre cada una de las placas conteniendo distinta concentración de cobre; llevando cuidado de agitar de vez en cuando el stock de bacterias así como de utilizar una punta nueva en cada caso. Se procederá de menor a mayor concentración de bacteria.

Finalmente se permite que se sequen en la campana unos minutos antes de cerrar las placas e incubarlas a 30°C un mínimo de 3 días.

## RESULTS

Para estudiar el efecto del ion cobre sobre *S. meliloti* se realizaron ensayos de “drop assay” enfrentando distintas diluciones de bacteria a distintas concentraciones de Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dos tipos de experimentos fueron llevados a cabo dependiendo de la duración del ensayo. Así para los estudios de pigmentación, se trabajo en bajas concentraciones de cobre y tiempos de crecimiento largo, mientras que en los estudios de resistencia, se trabajó a mayores concentraciones y a tiempos de crecimiento más cortos.



**Figure 1: Low concentration of Cu (>0.8mM) shows an effect on *S. meliloti* pigmentation.** Pictures show *S. meliloti* drop assays after 5 (B) or 8 (A) days of treatment. (A) Copper effect on 1021 and GR4. Drop assay performed on different Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration (0.0, 0.5 and 0.8 mM) on TY plates using serial dilutions of TY liquid culture of GR4 and 1021 *S. meliloti* strains at 0.5 O.D. (B) Copper effect on *S. meliloti* strains. Effect of 0.7 mM of Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on a Drop assay performed on TY plates using serial dilutions of TY liquid culture *S. meliloti* strains at 0.5 O.D. The strongest pigmentation is showed by AK83 strain.

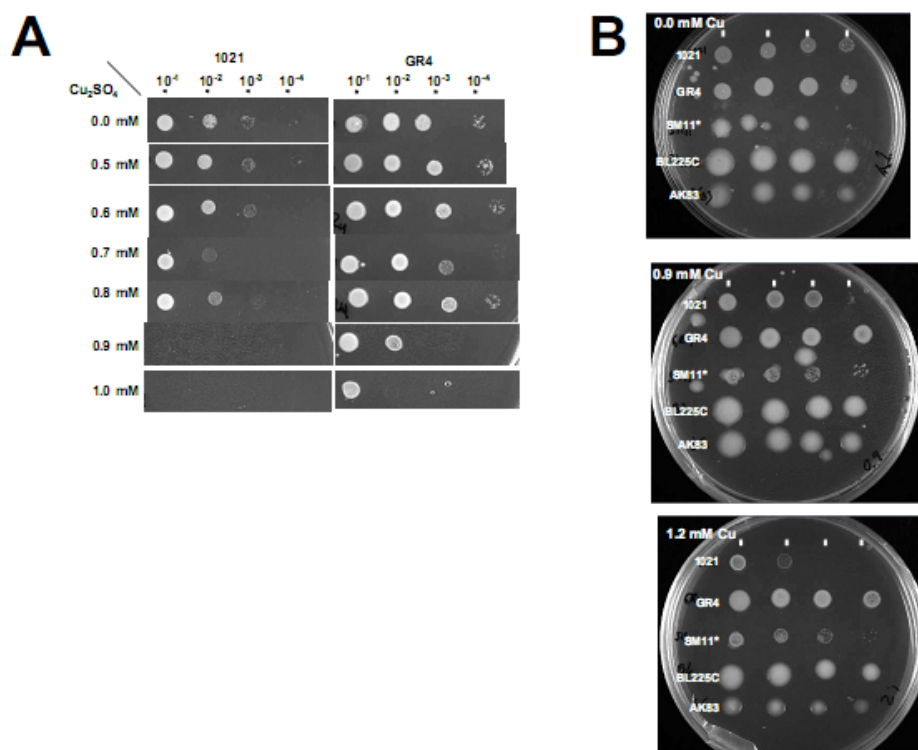
#### Pigmentación

Tiempos largos de incubación frente al ion cobre permitieron apreciar un fenómeno de pigmentación de los distintos aislados de *S. meliloti* específicos de la presencia de este ion (Fig. 1). Esta pigmentación parece estar relacionada con la síntesis de melanina característica de algunos aislados de esta especie (Cubo *et al.* 1988). De hecho, la comparación de diferentes

estirpes permitió observar que en algunos aislados este fenómeno era mucho más acusado (Fig. 1B; p. ej AK83, aislado del mar de Aral en Rusia)

### Resistencia

A diferencia del fenotipo de pigmentación observado tras largos periodos de incubación, el fenotipo de resistencia se analizó a tiempos más cortos (2-3 días) y a una curva de concentración del ion cobre de 0.0 a 1 mM (Fig. 2). La comparación entre el aislado de referencia 1021 y el que contenía el conjunto de genes relacionados con este metal (GR4) reveló que a partir de 0.6 mM se aprecia una diferencia en crecimiento entre ambos aislados, mientras que 1021 empieza a mostrar sensibilidad, GR4 no se ve afectada. El crecimiento de GR4 empieza a verse afectado a 0.9 mM de Cu (Fig. 2-A).



**Figure 2: Copper effect on *S. meliloti* growth**

Pictures show *S. meliloti* drop assays after 72 h 30°C. (A) Copper effect on 1021 and GR4. Drop assay performed on different  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  concentration on TY plates using serial dilutions of TY liquid culture of GR4 and 1021 *S. meliloti* strains at 0.5 O.D. GR4 shows more resistance than 1021 to Copper ion.

(B) Copper effect on *S. meliloti* strains. Drop assay plates containing different  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  concentration (0.0, 0.9 and 1.2 mM) and *S. meliloti* strains (described on Table 1) after 72 h at 30°C. It must be noted that drops of SM11 strain (denoted with an asterisk) contain significantly less amount of bacteria.

Con objeto de determinar si este perfil de resistencia era una propiedad de GR4 ó bien un defecto de 1021, se analizaron nuevas estirpes de distinta procedencia (Tabla 1) y de las que se dispone de toda la información genética (Fig. 2-B). Como se puede apreciar, 1021, es la única estirpe que de forma clara mostró un fenotipo de crecimiento sensible al ion cobre. A la espera de conocer y comparar los distintos genomas de las bacterias analizadas sí podemos decir, que dos de ellas BL225c y AK83 presentan un fenotipo de exopolisacárido positivas (se incrementa el carácter mucoso en cultivo sólido) que puede tener un efecto generalizado en la resistencia a cobre frente a las cepas GR4 y SM11.

## CONCLUSIONS

Low-concentrations of Copper ion (<0.8mM) causes a pigmentation effect in the bacterium *Sinorhizobium meliloti*; this effect is specific of each isolate (i.e. it is very pronounced for the isolate AK83). Comparison of Copper ion resistance phenotype between isolates 1021 and GR4 suggests that the resistance of GR4 could be due to a set of 10 genes found in the cryptic plasmid pRmeGR4a of this strain. However, this resistance phenotype also appears in other isolate, and it could be explained by an alternative phenotype as Exopolysaccharide producers (EPS+).

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was performed in the Microbiology and Symbiotic Systems Department in the Estación Experimental del Zaidín – Consejo Superior de Investigaciones Científicas. It was supported mainly by research project MICINN Consolider-Ingenio 2010. CSD2009-00006; Scientific research by Young Students in Science (PIIISA2012; <http://emc2astronomy.blogspot.com/>). Institutos de Educación Secundaria de Granada: Padre Manjón, Angel Ganivet y Fray Luis de Granada. Also we appreciate the coordination of teachers M<sup>a</sup> Concepción Martínez and Javier Cáceres.

## REFERENCES

- Casadesús J, Olivares J. (1979) Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. Mol Gen Genet. 174:203-9
- Cubo MT, Buendia-Claveria AM, Beringer JE, Ruiz-Sainz JE. (1988) Melanin production by *Rhizobium* strains. Appl Environ Microbiol. 54:1812-1817.
- Galardini M, Mengoni A, Brilli M, Pini F, Fioravanti A, Lucas S, Lapidus A, Cheng JF, Goodwin L, Pitluck S, et al. (2011) Exploring the symbiotic pangenome of the nitrogen-fixing bacterium *Sinorhizobium meliloti*. BMC Genomics. 12: 235.
- Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, et al.(2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science. 293:668-672.
- Schneiker-Bekel S, Wibberg D, Bekel T, Blom J, Linke B, Neuweiger H, StiensVorhölter FJ, Weidner S, Goesmann A, Pühler A, Schlüter A. (2011) The complete genome sequence of the dominant *Sinorhizobium meliloti* field isolate SM11 extends the *S. meliloti* pan-genome. J Biotechnol. 155: 20-33.

## MY OWN IDEAS

Blanca Barón Torcal, IES Padre Manjón

Microbiology is the science of biology devoted to study the organisms that are only visible under a microscope: simple prokaryotes and eukaryotes. They are considered all living microorganisms. I think that microbiology is a science very important today because microbiologists have made contributions to biology and medicine, especially in the fields of Biochemistry, Genetics and Cell Biology. Microorganisms have many characteristics that make them "model organisms" ideal for study. Therefore, it is a very complex science with many aspects to consider for study.

The ecosystem *Sinorhizobium meliloti-alfalfa* has a very important impact in crops because it is a bacterium responsible for fixing nitrogen from the soil in leguminous plants. This feature has allowed us to advance the study of bacteria. Here we find the genome, (microbial genetics) that allows us to study the organization of microbial genes and how they affect different cells, which is very useful for Microbiology. Whenever we have a problem we solve first theory, then we put it into practice. In science it is the same, and like all sciences, microbiology is essential to corroborate the assumptions we make, and we do it through experience. First, we face a problem we want to solve; then, we developed a hypothesis to give a possible answer to this conflict. Then, we put this hypothesis into practice through experience, subjecting it to several cases, so we can determine the truth of such hypothesis. After the experience, we conclude developing a possible theory or law is met in all cases. This is the fundamental method used by science to solve any hypothesis. In the process one must be careful, meticulous, and use appropriate methods to reach the truth in as much detail as possible. So you have to devote much time to research and find an explanation for everything. When we know the results of scientific work is our duty to make them known to the community; either to help others and enrich work, or to simply expose people and data on any subject. Therefore, communicating data in a scientific project is the basis of any project, because if not we disclosed that work is useless, never come to light and consequently would not do advances in science research.

From my point of view, a good scientist should have some essential qualities, such as a tidy, organized, observing the order above all, it is also advisable to be careful, that is, note even the smallest fully in any investigation. But in my opinion, the most important thing is to be a person who is not tired of searching, research, know, know, have ambition and purpose of the work done to observe, learn and present the conclusions he draws, for enrich science and society of which it forms part.

*La microbiología es la ciencia de la biología dedicada a estudiar los organismos que son sólo visibles a través del microscopio: organismos procariotas y eucariotas simples. Son considerados microbios todos los seres vivos microscópicos. Yo pienso que la microbiología es una ciencia muy importante en la actualidad porque los microbiólogos han hecho contribuciones a la biología y a la medicina, especialmente en los campos de la bioquímica, genética y biología celular. Los microorganismos tienen muchas características que los hacen "organismos modelo" ideales para su estudio. Por ello, es una ciencia muy compleja con numerosos aspectos a tener en cuenta para su estudio.*

*El ecosistema Sinorhizobium meliloti-alfalfa tiene una misión muy importante en los cultivos, ya que es una bacteria encargada de fijar el nitrógeno del suelo en las plantas leguminosas. Esta función nos ha permitido avanzar en el estudio de las bacterias. Aquí encontramos el estudio genómico, (genética microbiana) que nos permite estudiar la organización de los genes microbianos y cómo afectan a las distintas células, lo que resulta muy útil para la microbiología.*

*Siempre que tenemos un problema lo resolvemos primero en teoría, y luego lo ponemos en práctica. En la ciencia ocurre lo mismo, y como todas las ciencias, en la microbiología es fundamental corroborar las suposiciones que hacemos, y lo hacemos a través de la experiencia. Primero, nos enfrentamos a un problema que queremos resolver, a continuación elaboramos una hipótesis, para dar una posible respuesta a ese conflicto. Luego ponemos esa hipótesis en práctica a través de la experiencia, sometiéndola a varios casos, y así poder determinar la veracidad de esa hipótesis. Una vez realizada la experiencia, concluimos elaborando una posible teoría o ley si se cumple en todos los casos. Este es el método fundamental utilizado por la ciencia para resolver una hipótesis. En el proceso es imprescindible ser cuidadosos, meticulosos, y utilizar los métodos adecuados para alcanzar la verdad de la forma más detallada posible. Por ello hay que dedicar mucho tiempo a la investigación y buscar una explicación a todo. Cuando conocemos los resultados de un trabajo científico nuestra obligación es darlos a conocer, ya sea para ayudar a otros trabajos y enriquecerlos, o para, simplemente, exponerlos a la gente y aportar datos sobre cualquier tema. Por tanto, comunicar los datos de un proyecto científico es la base de ese proyecto, ya que si no se da a conocer no nos sirve de nada ese trabajo, nunca saldría a la luz y como consecuencia no haríamos avances en la ciencia de la investigación.*

*Desde mi punto de vista, un buen científico debe tener unas cualidades esenciales, como ser una persona ordenada, organizada, que respete el orden por encima de todo; también es conveniente que sea meticuloso, es decir, que tenga en cuenta hasta el más mínimo detalle en cualquier investigación. Pero en mi opinión, lo más importante es que sea una persona que no se canse de buscar, investigar, saber, conocer, con ambición y que tenga como finalidad de su trabajo el hecho de observar, conocer y exponer las conclusiones que saca, para enriquecer a la ciencia y a la sociedad de la que forma parte.*

**Ana Guardia Molina, IES Ángel Ganivet**

This project allowed me to learn more about Microbiology. I believe the development of this discipline is very important because microorganisms have wide applications in the industrial field, in the production of pharmaceutical interest (like drugs) and biotechnology. Also play an essential role in research laboratories in Molecular Biology. I think, although the study of the genome of the bacteria is well advanced (in many cases is known entire genome of a bacteria species), there are a variety of genes not yet have information, so you should keep the focus on this area for development.

In this project I have learned how to construct a hypothesis and experimental design to resolve it. I have found that is quite difficult to solve a hypothesis because you do not know the final result of your experiments; sometimes they are unpredictable. In some cases the hypothesis may be wrong, in other cases, we can get to place completely different from what we planned our starting point.

It's important to communicate the results of scientific work because it is the only way that any society can meet and dispose of them if needed.

In summary, a good scientist must be calm, capable of reflection and discussion of his ideas, with a high level of English (and if is possible in other languages), and with the ability to properly expose his projects and organize a work-plan and ideas.

*Este proyecto me ha permitido conocer más de cerca la microbiología. El desarrollo de esta disciplina me parece de gran importancia ya que los microorganismos tienen amplias aplicaciones en el terreno industrial, en la producción de interés farmacéutico (como los medicamentos) y biotecnológico. Además juegan un papel esencial en los laboratorios de investigación en Biología Molecular.*

*Opino que, aunque el estudio genómico de las bacterias está muy avanzado (puesto que se conoce en muchos casos todo el genoma de las mismas), hay gran variedad de genes de los que aún no se tiene información, por lo que se debería mantener la atención en este campo para su desarrollo.*

*En este proyecto he podido aprender cómo se construye una hipótesis y el diseño experimental para resolverla. He podido comprobar que es bastante difícil resolver una hipótesis ya que no conoces cómo acabaran los experimentos que realices. En algunos casos la hipótesis puede ser errónea, en otros, podemos llegar a un lugar totalmente distinto al que habíamos planificado en nuestro punto de partida.*

*Creo que es importante comunicar los resultados de un trabajo científico porque es la única forma de que toda la sociedad pueda conocerlos y disponer de ellos si los necesita.*

*Un buen científico debe ser una persona serena, con capacidad de reflexión y argumentación de sus ideas, con un alto nivel de inglés (y si es posible de otros idiomas), con la habilidad de exponer correctamente sus proyectos así como de organizar su trabajo e ideas.*

**Angela Liébana Medina, IES Fray Luis de Granada**

In that science project, we have been studying *Sinorhizobium meliloti* behavior in different situations, all of them started by copper ion.

This project has let me see how a microbiologist works day by day, some of its techniques and methods, and how it can seem that he is working with anything, but however he is doing much more than anyone can imagine, because Microbiology is an important discipline that we can not underestimate, it works with microscopic forms of life but it is not a reason to look down on it because these microorganisms make fundamental processes as we can see. An example of it is the bacterium *S.meliloti*, which lives, forming nodules, in the roots of the *Alfalfa*, a kind of leguminous plant. A symbiotic relationship is been produced, because *S.meliloti* works as a nitrogen-fixing bacterium, a really important job for the correct

preservation of the environment. But in our project, we have studied other properties of the bacterium, which are related with copper effects on it. It has been possible because of the knowledge of the genome of this specie, this fact, I think, is key on this kind of studies, because almost everything has something to do with genetics, just because genetic is the base of everything.

During this project I have been watching how a Microbiology laboratory works, how can go to waste everything if a little detail fails, and how can appear unexpected results, but nevertheless they are even more useful than any other that have been planned before. On the other hand I have realized that anything is so easy that it seems, results do not appear from nothing, each project takes its time to act and even more important its time to think.

In summary, I would like to say that it has been a grateful experience and above all I have learned about how my future may be.

*Nuestro proyecto científico ha estado orientado al estudio del comportamiento de Sinorhizobium meliloti en diferentes situaciones, todas ellas protagonizadas por el ion cobre.*

*Este proyecto me ha permitido ver cómo trabaja un microbiólogo en su día a día, algunas de sus técnicas y métodos y cómo puede parecer que no está trabajando con nada, aunque sin embargo está haciendo mucho más de lo que cualquiera podría imaginar, porque la Microbiología es una importante disciplina que no podemos subestimar, trabaja con formas de vida microscópicas, pero no es una razón para despreciarla puesto que estos microorganismos son fundamentales en los procesos que sí que podemos ver. Un ejemplo de esto es la bacteria S.meliloti, que vive formando nódulos en las raíces de la Alfalfa, una planta leguminosa. Se produce una relación simbiótica, porque S.meliloti actúa como una bacteria fijadora del nitrógeno, una tarea muy importante para la correcta preservación del medio. Pero en nuestro proyecto, hemos estudiado otras propiedades de la bacteria, que están relacionadas con los efectos que el cobre tiene sobre ella. Esto ha sido posible debido al conocimiento genómico de la especie, pienso que este hecho es la clave de este tipo de estudios, porque casi todo está relacionado con la genética, ya que la genética es la base de todo.*

*Durante este tiempo he visto cómo funciona un laboratorio de Microbiología, cómo puede desperdiciarse todo si un pequeño detalle falla, y cómo pueden aparecer resultados inesperados, que no obstante, pueden ser más útiles que ningún otro que hubiese sido planeado con anterioridad. Por otro lado, me he dado cuenta de que nada es tan fácil como parece, los resultados no aparecen de la nada, y cada proyecto lleva su tiempo de hacer cosas (actuar) y más importante aún su tiempo de pensar.*

*Para terminar, me gustaría decir que ha sido una experiencia muy agradecida, y sobre todo que he aprendido sobre cómo podría ser mi futuro.*

## **Sara Miñán Polo, IES Padre Manjón**

Microbiology is from my point of view a very interesting science because in science, in all the sciences, is necessary to know the basics, the fundamentals. Microbiology is a basic science in biology. Thanks to their study, their understanding and communication can come to know the biology, so that science is essential. We can not forget that the field of microbiology is very large, as much or even more so than biology, a discovery leads to another, and this to one further, and so on, it is a never-ending story.

At the ecosystem *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa is remarkable success in using commercial inoculants to improve crop yields of legumes as nitrogen-fixing bacteria. As a result of Rhizobium strains used are not only highly effective but are also very competitive with the indigenous populations of rhizobia. The genome of the bacteria is a very useful science, allowing us to progress in many areas of daily life, such as medicine, drugs, pharmacy, diseases, etc. Like all science, Microbiology must be corroborated by experiences that increase their accuracy and reduce any doubts. I think a very effective way to establish a theory or a simple deduction, the experience, the success is the key, that if he fails, the whole theory discovered and previously thought becomes false automatically. In the experimental work is needed great care with all the elements to enhance the chances of success of the experiment.



Once the experience and proven the veracity of the alleged theory, we develop a hypothesis and make known what we discovered. This is essential for the advancement of science, we must communicate the data from scientific papers to make them known, thus exposing a part of our discovery, we help other research, clarifying ideas and corroborate other, therefore see that it is absolutely essential. All hypotheses must be signed either by a research team, a student, teacher, or whoever. In my opinion it is important to know who or who have obtained such data and have given the light as if anonymous, anyone could appropriate the merit and establish the same hypothesis as his own.

Every good scientist should have a calm personality, because it takes a lot of patience in this area when doing research, laboratory experiences, all need to know everything to expect and take your time. One of the qualities required is a scientist, it is impossible that a disorderly person to carry out an investigation. Well, it's possible, but with many more difficulties. Physical disorders also lead to mental disorders; in consequence the research itself ends up being a huge mess.

A good scientist likes his job, likes to investigate, collect information and work hard, fail and never give up, try again, always be optimistic and applying for all their knowledge. In a research team, may members have different careers and therefore apply different inputs, making it much more efficient teamwork in these cases. A scientist must know how to work with other scientists, know to criticize and accept criticism on his own research. But, over all, enjoy what he does.

*La microbiología es desde mi punto de vista una ciencia muy interesante, ya que en el ámbito científico, en todas las ciencias es necesario conocer las bases, los cimientos. La microbiología es la ciencia base de la biología, gracias a su estudio, su comprensión y su comunicación podemos llegar a conocer la biología; por tanto, esta ciencia es imprescindible. No podemos olvidar que, aunque es una ciencia "base", el ámbito de la microbiología es muy extenso, tanto o incluso más que la biología; un descubrimiento nos lleva a otro, y éste a otro posterior, y así sucesivamente; es un nunca acabar. En cuanto al ecosistema Sinorhizobium meliloti-alfalfa es notable su éxito en la utilización de inoculantes comerciales para mejorar el rendimiento de las cosechas de leguminosas, ya que es una bacteria fijadora de nitrógeno. Como resultado las cepas de Rhizobium utilizadas no sólo son muy efectivas, sino que también son muy competitivas con respecto a las poblaciones autóctonas de rizobios.*

*El estudio genómico de las bacterias es una ciencia muy útil, ya que nos permite avanzar en muchos ámbitos de la vida cotidiana, como la medicina, medicamentos, farmacia, enfermedades, etc. Como toda ciencia, la microbiología debe de ser corroborada por experiencias que aumenten su veracidad y disminuyan las posibles dudas; me parece una forma muy eficaz para establecer una teoría o una simple deducción, la experiencia, el éxito de la misma es la clave, ya que si fracasa, toda la teoría descubierta y pensada anteriormente se vuelve falsa de manera automática. En el trabajo experimental es necesario un gran cuidado con todos los elementos para favorecer las posibilidades de éxito del experimento, una vez realizada la experiencia y comprobado la veracidad de la teoría supuesta, debemos elaborar una hipótesis y dar a conocer lo que hemos descubierto. Esto es imprescindible para el avance de la ciencia, debemos comunicar los datos obtenidos en los trabajos científicos para darlos a conocer, de esta forma, a parte de exponer nuestro descubrimiento, ayudamos a otras investigaciones, se aclaran ideas y se corroboran otras, por tanto vemos que es completamente esencial. Toda hipótesis debe ser firmada, ya sea por un equipo de investigación, un alumno, profesor, o quien sea, en mi opinión es importante saber quien o quienes han obtenido esos datos y los han dado a la luz, ya que si es anónimo, cualquiera podría apropiarse del mérito y establecer una misma hipótesis como suya.*

*Todo buen científico debe de tener una personalidad tranquila, ya que se necesita muchísima paciencia en este ámbito, a la hora de hacer investigaciones, las experiencias en laboratorio, todo requiere saber esperar y llevar todo a su tiempo. Una de las cualidades que debe tener un científico es el orden, es imposible que una persona desordenada pueda llevar a cabo una investigación, bueno, es posible, pero con muchas más dificultades, el desorden físico también lleva al desorden mental, por tanto la investigación en sí acaba siendo un desorden descomunal. A un buen científico le gusta su trabajo, le gusta investigar, recaudar información y trabajar horas y horas, fallar y no rendirse nunca, volver a intentarlo, siempre de forma optimista y aplicando para todo sus conocimientos; en un equipo de investigación, puede que los miembros tengan diferentes carreras y por tanto aplican diferentes aportaciones, por lo que es mucho más eficiente un trabajo en equipo en estos casos. Un científico debe saber trabajar con otros científicos, debe saber criticar y aceptar críticas, y sobre todo que disfrute con lo que hace.*

**Jose Manuel Sanjuán Parra, IES Padre Manjón**

When I decided to become jumbled in this project I hoped that they gave me one of the projects that I selected; when they assigned to me this project I did not know which I was going to find.

In the scientific aspect, I have to review the importance of the microbiology in science since, although it seems insignificant, in the project I have realized that in these organisms occurs essential processes for the life, and like ecosystem, everything is absolutely important, the loss of some of them can suppose a disaster.

In this project about *Sinorhizobium meliloti* and the symbiosis formed with plants of alfalfa is observed an essential union for life. These bacteria fix nitrogen and they transform it into ammonia that the plants take advantage of, and it makes possible the existence and survival of the species, and that we use to make our molecules. In the study of microorganisms it is essential to know the genome, so that they give tracks us of its phenotypes and the possible consequence.

In order to solve hypothesis it is important to verify it and to demonstrate its veracity by means of an experimental design that is essential to make to obtain results that confirm or deny our hypothesis. Once obtained results its spreading is advisable, because it can even suppose an aid or the base for another project. In science we must work like a team, understanding by team not only when the members can see each other but when there is a flow of information independently of the place where their members are.

For this type of work, the certainty the tenacity, the patience, the good one for making, for letting to a side the individualities to work as team is necessary personal values at the time of working.

In conclusion, although not project was one of my first options I am glad to have been in this, because a world related to the investigation has been opened in front of me, that it attracts to me, but puts difficult still more the election of a future profession.

*Cuando decidí involucrarme en este proyecto esperaba que me dieran uno de los proyectos que yo preseleccioné; cuando me asignaron este proyecto no sabía con lo que me iba a encontrar.*

*En el aspecto científico he de reseñar la importancia de la microbiología en la ciencia ya que, aunque parece insignificante, en el proyecto me he dado cuenta que en estos organismos se dan procesos necesarios para la vida, y que como ecosistema, todo absolutamente es importante, la pérdida de alguno de ellos puede suponer un desastre.*

*En este proyecto acerca de Sinorhizobium meliloti y la simbiosis formada con plantas leguminosas de alfalfa se observa una unión esencial para nuestra vida. Estas bacterias fijan el nitrógeno atmosférico y lo transforman en amonio que aprovechan las plantas.*

*En el estudio de microorganismos es esencial conocer el genoma, de manera que nos den pistas de sus fenotipos y de las posibles consecuencias de los mismos.*

*Para resolver hipótesis es necesario en primer lugar, comprobarla y demostrar su veracidad por medio de un diseño experimental, que es imprescindible realizar para obtener resultados que confirmen o desmientan nuestra hipótesis de partida. Una vez obtenidos resultados es conveniente su divulgación, porque puede suponer una ayuda o incluso la base para otro proyecto.*

*En ciencia debemos trabajar como equipo, entendiendo por equipo no solo cuando se trabaja codo a codo sino cuando hay un flujo de información independientemente del lugar donde se encuentren sus miembros. No existen informaciones individuales, ya que la aportación de cada uno de los miembros de este equipo, es útil para otros miembros y otros equipos. Para este tipo de trabajo, la constancia la tenacidad, la paciencia, dejar a un lado las individualidades para trabajar como equipo son valores personales necesarios a la hora de trabajar.*

*En conclusión, a pesar de que no era una de mis primeras opciones estoy contento de haber estado en este proyecto porque se ha abierto ante mí un mundo relacionado con la investigación, que me atrae, pero pone aún más difícil la elección de una futura profesión.*